

M.H
PCT

世界知的所有権機関

特許協力条約



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/10, 11/00, C12Q 1/68, C07K 1/22</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/05357</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月3日(03.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03824</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月15日(15.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/206057 1998年7月22日(22.07.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 工業技術院長が代表する日本国(JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)[JP/JP] 〒100-8921 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号 Tokyo, (JP) プレジジョン・システム・サイエンス株式会社 (PRECISION SYSTEM SCIENCE CO., LTD.)(JP/JP) 〒206-0812 東京都稲城市矢野口1843-1 Tokyo, (JP)</p> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者 町田雅之(MACHIDA, Masayuki)[JP/JP] 〒305-0046 茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 田島秀二(TAJIMA, Hideji)[JP/JP] 〒206-0812 東京都稲城市矢野口1843-1 プレジジョン・システム・サイエンス株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 土橋 皓(DOBASHI, Akira) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番3号 第12森ビル6階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (DE, FR, GB)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: LABELED COMPLEX, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND PROCESS FOR UTILIZING THE SAME</p> <p>(54) 発明の名称 標識化複合体並びにその製造方法及び使用方法</p> <p>(57) Abstract A labeled complex which makes it possible, as a multimolecular marking in combinatorial chemistry, to stably and clearly distinguish various fine substances of several thousand or several ten thousand order or more at a high sensitivity and a high accuracy and to simultaneously satisfy the requirements for improving the ability to capture targets, enhancing the distinguishing sensitivity and elevating the number of substances to be distinguished. The above labeled substance is composed of a fine particle, a number of target-carrying substances each bonding at one end to the fine particle, and a label bonding to each target-carrying substance at another end, wherein each of the target-carrying substances carries one or more targets or is capable of carrying the same, and the whole labeled substance is constituted so that definite targets are contained therein at a definite ratio and distributed to the support and all of the target-carrying substances bonded thereto.</p>		

本発明は、標識化複合体並びにその製造方法及び使用方法に関し、コンビナトリアル・ケミストリにおける多分子マーキングとして、数千、数万のオーダー以上の種々の微小物を高感度、高精度、安定的、且つ明瞭に峻別することを可能とするとともに、標的に対する捕獲能力の向上と、識別感度の向上と、識別数の増加との全てを同時に満足させることを目的とする。

本発明は、1個の微小粒子と、その微小粒子に一端が結合した多数の標的保有体と、各標的保有体の他端で結合した標識物質とからなり、その標的保有体は、1または2以上の種類の標的を保有し又は保有可能であり、その標識物質の全体は、所定の種類が所定の量比含まれるとともに、その担体と結合する標的保有体の全てに分配されるように構成したものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャド
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	HR	クロアチア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IN	インド	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KD	北マケドニア				
DE	ドイツ						

明 細 書

標識化複合体並びにその製造方法及び使用方法

技術分野

本発明は、標識化複合体並びにその製造方法および使用方法に関する。単
5 位体積当たりの表面積が大きい微小粒子等の担体は、生物学的分子を取り着
けるための優れた固体を提供するとともに、これらの担体を蛍光等の発光物
質で標識化することは、高い感度でのそれらの検出を可能にする。本発明は
、農学、薬学、医学、化学または生物学等の理学、工学の分野で、遺伝子操
作や医療、薬品、生理衛生、保健、生物、食品または材料等の種々の領域で
10 、検査、測定、反応、生産、抽出または観察等を行うために用いるものであ
る。

技術の背景

従来から、微小物質を標識化して、高い感度で識別するために、蛍光等の
15 発光物質が用いられている。例えば、試料中の核酸を測定するため、蛍光性
微小粒子を結合したDNAプローブと、異なるDNAプローブと結合した粒
径の大きい非蛍光性微小粒子とを用いて、試料中のDNAプローブとハイブ
リダイズして、二本鎖を形成させる。その後、2種類の微小粒子の粒径の中
間径のフィルタで、未結合の余剰蛍光粒子を除去し、制限酵素を作用させて
20 、2本鎖部位を切断し、遊離した蛍光性微小粒子をフィルタで分別し、フロ
ーセルに導入して蛍光によって粒子を識別し粒子数を計数することによって
、試料中のDNAプローブの濃度の測定の自動化を行うものがあった（特開
平6-343496）。

または、被検物質中の特異性のある部分Aに結合する物質を結合させた蛍
25 光波長Xの蛍光微粒子Pと、被検物質中の上記部分Aとは異なる、特異性
のある部分Bに結合する物質を結合させた蛍光波長Yの蛍光微粒子Qとを用い
て、被検物質中に蛍光微粒子P、Qの両者を特異的に結合させて、得られた
混合液をフローサイトメータに一定量流し、上記溶液中の蛍光微粒子P、Q
の発する前方散乱光、上記蛍光波長X、Yをそれぞれ含む2種類の蛍光を測

定することによって、リガンドとの反応によるラテックス凝集を識別して粒子計測装置で測定するものがあった（特開平 5 - 1 0 7 2 4 9）。

- ところで、以上説明したように、従来では、各粒子にはせいぜい 1 種類の蛍光物質が付着させるか、または、蛍光物質そのものを微小粒子状に形成し
- 5、その粒子に結合物質を付着させて用いるものであった。一方、DNA等の生体化合物に悪影響を与えずに、且つ高感度で識別可能な蛍光物質の種類は限られ、せいぜい数十種類である。そのため、従来のやり方では、せいぜい数十通りの識別を実現することしかできず、例えば、数千、または数万の種類の目的物を蛍光物質だけで識別することはできなかった。
- 10 一方、多数の種類の目的物を複数種類の蛍光物質によって、識別可能とするために、これらの蛍光物質を組み合わせる微小粒子に付着させて抗原および/または抗体を検出するものがあった（特開昭 6 0 - 3 5 2 6 5）。しかし、微小粒子表面のような狭い領域に、多数の蛍光物質を高密度に付着することは、蛍光物質間のエネルギー移動やクエンチング（消光）が発生して、スペクトルの識別および蛍光強度に悪影響を与える。そのため、安定した状態
- 15 で、何千または何万以上の目的物の種類を、蛍光物質で微小粒子を標識化して識別するのは不可能であるという問題点を有していた。また、微小粒子表面への蛍光物質の付着量を増加させて、発光強度や識別数を増加させることと、微小粒子表面へ目的物質を捕獲させる能力を増加させたり、微小粒子表面が保有する情報量を増加させるために情報を保有するための領域面積を増加させることは相矛盾し、その双方の能力を満足させることができないという問題点を有していた。

- そこで、本発明は、第一には、コンビナトリアル・ケミストリにおける多分子マーキングとして、数百、数千、数万のオーダー以上の種々の微小物を
- 25 高感度、高精度、安定的、且つ明瞭に峻別することを可能とする標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第二には、物質の捕獲能力や情報保持能力の向上と、識別感度や識別数等の識別能力の向上との全てを同時に満足することができる優れた標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第三には、微小粒子等の担体を用いることで、単位体積または単位質量当たり多くの情報量を標識化することによって、多数の標識化した容器の使用を省略することができるので、省空間、装置規模の縮小を図るとともに、一斉に同一の条件で処理を加えることによって、精度が高く、効率的且つ迅速な処理を行うことができる標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第四には、磁性体粒子等の担体を標識化することによって、種々の多様な処理の自動化を分注から測定まで一貫して実現することができることによって、磁性体粒子の機能を飛躍的に増大することができる標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第五には、安価に、容易に、且つ安定した品質で製造することができるのと同時に、識別または測定が容易、高精度、且つ信頼性が高い標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第六には、汎用性または多様性のある使用をすることができる標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

第七には、種々の蛋白質等の物質と、種々の塩基配列に対して転写の制御を行うことができる転写制御因子および異なる塩基配列を有するDNA断片等の対応物質との間の関連性を見極めるためにきめ細かい標識化を可能にし、ガンや生物の発生等の研究、医薬や化学品製造や遺伝子技術等への多大の寄与をすることができる標識化複合体並びにその製造および使用方法を提供するものである。

発明の開示

以上の技術的課題を解決するために、第一の発明は、1個の担体と、その担体に結合した多数の標的保有体と、その担体が結合した部位と異なる部位で各標的保有体に結合した標識物質とからなり、その標的保有体は、1または2以上の種類の標的を保有しまたは保有可能であり、その標識物質の全体は、所定の種類が所定の量比含まれたものである。

ここで、「担体」は、特定の物質を保持可能であって、溶液に懸濁して用

いられる微小物体であって、例えば、粒子状、繊維状もしくはゲル状等の物体（特に形状にはとらわれない）を含む。また、親水性ポリマー等からなる、溶媒に可溶性の高分子の物体を含めても良い。形状に特に限定はないが、例えば、球状である。その粒径の大きさは特に限定されるものではないが、
5 好ましくは、約0.1 μm ～約1 mmのオーダーをもつものである。その微小粒子は、例えば、ポリスチレン、ナイロン等の合成樹脂のビーズ、ラテックス粒子、ガラスビーズ、ゲル状物質、または磁性粒子等の金属粒子で形成されるのが好ましい。

「標識物質」には、蛍光や燐光等の励起用光を必要とする発光物質に限らず、
10 励起用光を必要としない化学発光、生物発光であっても良い。その他、例えば、特定の物質と特異的に反応する物質や、放射性同位元素等の放射性物質、赤外線等の電磁波放射物質等であっても良い。また、これらを組み合わせることも可能である。尚、1個の担体に関する標識物質の全体は、1個の担体と結合する標的保有体の全てまたは略全てに分配されて結合
15 されるのが好ましい。これは分配された個々の標識物質間が離れてクエンチングを防止することができるとともに、製造を容易にするからである。各標的保有体への分配のしかたは、例えば、標識物質の1分子毎、等分子量毎、等量毎または1種類毎等がある。

標識物質および標的保有体を別個に各々微小粒子等の担体に結合させずに
20 、標識物質が結合した標的保有体をその担体に結合するのは次の理由からである。

(1) 数千または数万以上の種類を識別するために「種類」および「量比」を変えた大量の標識物質を限られた担体の表面に直接結合させることは、検査用物質や標的を結合または保有するための領域を狭め保有または捕獲能力
25 を劣化させるおそれがある。しかし、標的保有体自体に標識物質を結合させれば、標的や検査用物質の保有捕獲能力と識別能力の双方の能力の向上を図ることができる。

(2) 標的保有体に標識物質を結合させることによって、標識物質を微小粒子等の担体に直接取り付ける場合に比較して、標識物質間の間隔、距離を広

げ、標識物質間のエネルギー移動やクエンチングの発生を防止し、大量の標識物質をその担体にもたせても安定した発光等による識別の可能性をより確実に保証することができる。

- (3) 微小粒子等の担体に担持させているので、液体中での懸濁や分布を一樣且つ均一に行うことができるので、統計上の誤差を小さくして信頼性および精度の高い処理を行うことができる。

標的保有体を微小粒子等の担体に固定するには、例えば、担体が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ビオチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的若しくは化学的結合等を含む結合を利用して行われる。

- 「標的」は、例えば、遺伝情報、免疫情報等の生物情報や化合物の構造等の情報そのもの、または、その情報を有するDNA等、アミノ酸、糖等の生体化合物を含む化合物や、細胞、ウィルス、細菌等の生物体や生物体の一部や、その他の種々の物質があり得る。また、「標的を保有し」とは、標的保有体が標的自体または標的を含有しまたは標的保有体が標的を吸着、反応、相互作用等によって保持する場合も含む。

「1または2以上の種類の標的」であるので、例えば、1担体につき複数種類の標的群毎に標識化することができるので、その標的群毎の共通の性質等を検査測定することができる。

- 「担体が結合した部位」および「異なる部位」は、各々2箇所以上であっても良い。また、「担体が結合した部位」と「異なる部位」が離れていればいる程、クエンチング防止の効果は高い。したがって、「担体が結合した部位」が標的保有体の一端であり、「異なる部位」が標的保有体の他端であれば最も好ましい。一端および他端にはその近傍も含む。

- 本発明によれば、標識物質の種類および量比を種々に特定することによって、数百、数千、数万のオーダー以上の種々の標的を対応付けて識別することが可能となる。また、種々の標識化複合体を同一容器に混合して一斉に処理を行っても、各標的は標識化されているので、各標的毎に処理結果を得ることができる。従って、各標的を識別するために多数の容器を用意する必要

がなく、迅速且つ効率的に行うことができる。

本発明によると、前述したように、微小粒子等の担体の表面上において、標識用領域の増加と、標的保有用領域の増加とが拮抗せず、むしろ、標的保有体の増加は、標的保有能力の増加と標識物質量の増加との双方をもたらす

5、識別数を含む識別能力を増加させることになる。また、標的保有体のみを変えることによって、多様で汎用的な処理が可能となる。また、本発明は標的保有体を介して標識物質を結合させ、微小粒子等の担体に直接標識物質を結合させるものではない。従って、標識物質間の間隔を、担体に直接結合するものに比べ、より広くとることができるので、標識物質間のエネルギー移動

10やクエンチング（発光物質を用いた場合）等の相互作用を防止して、多数の物質を高精度且つ安定的に識別することを可能とする。

第二の発明は、第一の発明において、前記標識物質の全体は、1個の担体と結合する標的保有体の略全てに分配され、1個の標的保有体は1種類の標識物質と結合したものである。本発明によると、結合する標識物質の種類が

15異なる標的保有体の個数を量比に応じて定めることができるので、構成が簡単かつ製造が容易となる。

第三の発明は、第一の発明または第二の発明のいずれかにおいて、前記標的保有体は、ある部位で前記担体と結合し、他の部位で前記標識物質と結合した線状、糸状、毛状、または棒状等の長細形状に形成されたものである。

20「長細形状」のサイズには、特に限定はないが、例えば、前記微小粒子の粒径に比較して、その粒径よりも太さは十分に細く、長さがその太さよりも長く、例えば、その粒径と同程度またはそれ以上に十分に長い形状であり、例えば、粒径の約10倍程度、例えば、約10 μm である。

長細形状に形成するのは、その端に発光物質等の標識物質を取り付けることによって、標識物質を微小粒子等の担体に直接取り付ける場合に比較して、担体との間隔、さらには標識物質間の間隔、距離を広げ標識物質間のエネルギー移動やクエンチングの発生を防止し、大量の標識物質を担体にもたせても安定した発光等の識別の可能性をより確実に保証するスペーサとしての役割を担わせるためである。本発明によれば、標識物質間の間隔を、担体に直

25

接結合するものに比べてより広くとることができるので、標識物質間のエネルギー移動やクエンチング（発光物質の場合）等による相互作用を防止して、例えば、数千、数万以上というような多数の物質を高精度且つ安定的に識別することができる。

- 5 第四の発明は、第一の発明ないし第三の発明のいずれかにおいて、前記標的保有体は、例えば、核酸、ペプチド、蛋白質、多糖体若しくは脂質等の生体高分子を含む化合物、または、ウィルス若しくは細菌等の生物体若しくはその一部、または、これらを保持し若しくは保持可能な物質である。本発明によれば、前記標的保有体として、核酸、または核酸以外の物質を用いること
10 ができる。例えば、核酸を用いた場合には、種々の蛋白質の中から、種々の塩基配列に対して転写の制御を行うことができる転写制御因子や異なる塩基配列を有するDNA断片を、多数の蛋白質または塩基配列等の物質をきめ細かく標識化することによって、迅速且つ容易に発見することができる。これによって、ガンや生物の発生等の研究への多大の寄与をすることができる
15 。その他、種々の物質を用いることによって種々の物質間の関連性、例えば、相互作用の強さ、構造の類似性等を認識することができる。

ここで、「核酸」は、狭義には、デオキシリボ核酸（DNA）およびリボ核酸（RNA）であり、広義には、PNA（Peptide Nucleic Acid）を含めても良い。RNAには、mRNA、tRNA、rRNAがある。また、DNA
20 、RNA全体のみならず、そのDNA、RNAの断片である場合も含む。尚、蛋白質、多糖体、脂質等には、抗原または抗体も含む。

- 第五の発明は、第一の発明ないし第四の発明のいずれかにおいて、前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、ある部位における一本鎖にのみ結合し、他の部位における他の一本鎖に前記
25 担体が結合したものである。標識物質が結合した部位と、担体が結合した部位はできるだけ離れた位置であるのが好ましい。二本鎖の一端と他端に相当する部位が最も好ましい。尚、例えば、標識物質として蛍光物質を用いた場合には、DNAまたはRNAに蛍光物質を結合させる方法としては、例えば、チオカルバミド結合等の共有結合によるものがある。本発明によれば、二

本鎖の核酸を標識物質によって、明瞭に識別することができる。

第六の発明は、第一の発明ないし第五の発明のいずれかにおいて、前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖のある部位にのみ結合し、その一本鎖の他の部位に前記担体が固定したものである。本発明によれば、その標的保有体を一本鎖に変性することによって、相補性や相同性等の関連性の高い塩基配列の組み合わせをハイブリダイズによって、迅速且つ確実に見極めることができる。

第七の発明は、第一の発明ないし第五の発明のいずれかにおいて、前記標的保有体は一本鎖の核酸である。ここで、一本鎖を得るには、例えば、熱処理や、アルカリ性溶液等を加える変性によって行うことができる。本発明によれば、その標的保有体を一本鎖に変性することによって、相補性や相同性等の関連性の高い塩基配列の組み合わせをハイブリダイズによって、迅速且つ確実に見極めることができる。

第八の発明は、第一の発明ないし第五の発明において、前記標識物質は、蛍光物質、燐光物質または化学発光等の発光物質である。

ここで、蛍光物質は、例えば、F I T C（フルオレッセイン イソチオシアネート）、ローダミン、イソチオシアネート、I R D 4 0、C Y 3若しくはC Y 5等の有機物質またはユウロピウム錯体等の長寿命の蛍光を発する無機物質がある。本発明は、標識物質として、蛍光または燐光等のルミネッセンス等による発光物質を用いたものである。これによって、標的の識別能力を高めるとともに、安定して且つ高い信頼性を得ることができる。

第九の発明は、第一の発明ないし第八の発明のいずれかにおいて、前記発光物質は、励起波長、発光波長、発光強度、発光偏光度、発光位相または発光寿命のいずれかによって、その種類識別可能である。ここで、「発光偏光度」とは、偏光した励起用光で蛍光分子を励起することにより、発生した蛍光がどの程度偏光しているかを測定する方法である。本発明によって、発光物質の種々の性質の相違を利用して、多数種類の標識化を可能とする。

第十の発明は、第九の発明において、前記担体には、アビジンおよびビオチン等の特異的に結合する化合物対の一方の化合物がコーティングされ、前

記標的保有体は所定塩基配列をもつDNA断片であり、その一端には前記化合物対の他方の化合物が結合し、他端には前記蛍光物質が結合したものである。ここで、「特異的に結合する化合物対」には、アビジンおよびビオチンの対の他DIG（ジゴキシジゲン）およびアンチDIG抗体の対等のような抗原および抗体の対がある。本発明によれば、安価、簡単且つ確実に、標的保有体を担体に固定化することができる。

第十一の発明は、第一の発明ないし第十の発明のいずれかにおいて、前記担体は、遠隔操作可能な磁性体粒子等の遠隔作用体を有するものである。

ここで、遠隔作用体には、磁性体粒子、荷電粒子、誘電体、走性微生物等がある。磁性体粒子を用いた場合には、例えば、磁力体を組み込んだピペット手段によって作業を自動化することができる。荷電粒子を担体に用いた場合には、標識物質に同じ電荷をもつようにすれば、互いに反発しあって、標識物質を互いに離間させることができる。特に、磁性体粒子で担体を形成した場合には、磁力手段をピペット手段の液通路内に及ぼす装置を用いることによって、分注、移動、懸濁、攪拌、分離、洗浄、回収、再懸濁等の処理を処理の開始から測定に至るまでを完全に自動化することができる。

第十二の発明は、第一の発明ないし第十一の発明のいずれかに係る標識化複合体を製造する方法において、標識物質と結合し、且つ特定の標的を保有しまたは保有可能な標的保有体を生成する工程と、その標的保有体を担体に結合する工程とを有するものである。2つの工程の順序は問わず、また同時に行われても良い。本発明によれば、標識物質を、例えば、微小等量、等分子量ずつ多数形成し、多数の標的保有体とともに、懸濁または混合等を行えば、容易かつ均一に標識物質と結合した標的保有体を生成することができる。同様に、多数の標的保有体と多数の担体とを懸濁または混合等を行うことによって、統計的誤差内で、多数の均質な標識化複合体を容易に製造することができる。また、本発明によって製造された標識化複合体は、担体表面上、標識用領域の増加と、標的保有領域の増加とが狭い担体表面で拮抗せず、むしろ、標的保有体の増加は、標的保有能力の増加と標識物質量の増加との双方をもたらし、識別数を含む識別能力を増加させることになる。また、

標的保有体のみを変えることによって、多様で汎用的な処理が可能となる。
また、本発明によって製造された標識化複合体は標的保有体を介して標識物質を結合させ、担体に直接標識物質を結合させるものではない。従って、標識物質間の間隔を、担体に直接結合するものに比べ、より広くとることができ
5 るので、標識物質間のエネルギー移動やクエンチング（発光物質を用いた場合）等の相互作用を防止して、多数の物質を高精度且つ安定的に識別することを可能とする。

第十三の発明は、第十二の発明において、前記担体に標的保有体を結合する工程は、標識物質の全体か、その標的保有体の種類またはその種類および
10 個数比に応じて定められた種類およびその量比となるように、標識物質と結合した標的保有体を多数懸濁させた液体中に、その標的保有体が結合されるべき担体を混合することによって行うものである。ここで、「多数」は統計誤差が無視できる程の数である必要がある。「量比」は、その統計誤差を越えるような大きさの明確なオーダーの比をもつように定める必要がある。また、
15 「懸濁」は標的保有体が十分に均質になるように攪拌するのが好ましい
本発明によれば、標識物質の特定した種類か特定した量比をもつように結合した標的保有体を多数懸濁させた液体中に担体を混合させるようにしている。担体は多数のその標的保有体の中からランダムに選択した標的保有体の一部と接触し且つ結合することになる。従って、担体と接触且つ結合した標
20 的保有体のもつ標識物質の種類および量比は、懸濁させた標的保有体全体がもつその標識物質の種類および量比を統計誤差内で反映し、標的保有体はランダムに選択されるので、意図した種類および量比を統計誤差内で忠実に反映した標識物質をもった標識化複合体を簡単に且つ精度良く製造することができる。

25 尚、標識物質と結合した標的保有体を生成する工程についても、標識物質の全体を、結合されるべき標的保有体の種類またはその種類および個数比に応じて定められた種類およびその量比となるように懸濁した液と、多数のその標的保有体とを混合することによって行うことができる。

第十四の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程

は、標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸を合成し、その塩基配列と関連性の高い、前記担体と結合可能に加工された他の一本鎖の核酸を合成し、これらをアニーリングによって二本鎖の核酸を生成する工程を有するものである。ここで、「関連性が高い」には、相補性または相同性の高い場合を、相互作用が強い（親和性が高い）場合を含む。本発明によれば、安価に且つ容易に種々の標的保有体を生成することができる。

第十五の発明は、第十三の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライマと、前記担体と結合すべき他の一本鎖の核酸の複製用の第2のプライマとを用いて、二本鎖のその核酸を合成しおよび増幅する工程を有するものである。第十六の発明によれば、容易、迅速且つ大量に標的保有体従って標識化複合体を製造することができる。

第十六の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を担体に結合する工程または前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質または前記担体のどちらか一方と結合し、所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライマを用いて、二本鎖のその核酸を合成および増幅するとともに、前記標識物質または担体が結合している端部と反対側の端部に制限酵素処理を施し、制限酵素処理が施された端部にDNAリガーゼ等からなるアダプタを介して担体または標識物質を、前記標識物質または担体が結合している一本鎖側に結合して、標的保有体を担体に結合し、または標的保有体を生成するものである。本発明によれば、標識の標的である塩基配列と相補性または相同性等の関連性の高い塩基配列を見出すための標識化複合体を容易且つ大量に製造することができる。

第十七の発明は、第十六の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質および前記担体と結合していない方の一本鎖を変性によって除去する工程を含むものである。本発明によれば、標識の標的である塩基配列と相補性または相同性等の関連性の高い塩基配列を見出すための標識化複合体を容易且つ大量に製造することができる。

第十八の発明は、第十二の発明において、前記担体に標的保有体を結合す

る工程は、担体が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ビオチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的または化学的結合を含む結合を利用して、前記標的保有体と担体とを懸濁することによって、前記標的保有体と担体とを結合するものである。これによって、種々の標識化

5 複合体を得ることができるので多様な処理に使用することができる。

第十九の発明は、第十二の発明において、前記標的保有体を生成する工程は、ある部位で標識物質に結合し、他の部位で特異的に結合する化合物対の一方が結合した複数個の標的保有体を生成する工程であり、その標的保有体を担体に結合する工程は、前記化合物対の他方がコーティングされた担体と

10 、その標識物質が結合した前記標的保有体とを液体中で懸濁することによって、その標的保有体を担体に結合する工程である。

第二十の発明は、第一の発明ないし第十一の発明のいずれかに係る標識化複合体の標的およびその標的に対応付けられた標識物質の種類若しくは量比が相互に異なる複数種類の標識化複合体を多数有する標識化複合体群の中から、目的とする種類の標識化複合体を選別する工程と、選別されたその標識化複合体が標識化した標的を識別する工程とを有するものである。

15

本発明によれば、標識物質の種類および量比を種々に特定することによって、数百、数千、数万のオーダー以上の種々の標的に対応付けて識別することが可能となる。本発明によれば、種々の標識化複合体を同一容器に混合して一斉に処理を行っても、各標的は標識化されているので、各標的毎に処理結果を得ることができる。従って、各標的を識別するために多数の容器を用意する必要がなく、迅速且つ効率的に行うことができる。

20

第二十一の発明は、第二十の発明において、前記選別工程は、液通路と、その液通路内に磁場作用を及ぼすことが可能な磁力手段とを有し、液体の吸引または吐出を行うピペット手段を用いて、前記標識化複合体に対して、またはその標識化複合体および選別用物質に対して、定量、分離、分取、分注、清澄、懸濁、攪拌、濃縮、希釈、混合、接触、保持、捕獲、洗浄、変性、インキュベーション、温度制御、抽出、回収または移送等の作業によりまたはこれらの作業の組み合わせによって、処理が行われるものである。

25

ここで、前記ピペット手段は、単一のもののみならず、複数の先端部、液通路、および貯溜部を集積化した装置であっても良い。また、液通路は、先端部と貯溜部とを有するピペット手段において、その先端部とその貯溜部とを結ぶものであっても良い。流体の吸引吐出は、液通路内の圧力を制御する

5 圧力制御手段によって行う。本発明によれば、各種作業またはその組み合わせを自動的に、迅速、容易、効率的且つ精度良く実行することができる。

第二十二の発明は、第二十の発明または第二十一の発明のいずれかにおいて、前記選別工程は、前記標識化複合体群を懸濁する工程と、その標識化複合体群が懸濁した懸濁液と、目的とする標識化複合体を選別するための選別

10 用物質とを接触させる工程と、その選別用物質と結合した標識化複合体を抽出または分離する工程とを有するものである。ここで、「接触」は、例えば、両者を混合することによって、または、一方が固定された容器へ他方を注入すること等によって行う。本発明によれば、各標的と親和性の高い、または何らかの相互作用のある標的保有体の組み合わせを知ることができる。こ

15 れによって、相補性、相同性または類似性のある構造等の何らかの関連性を知ることができるので、例えば、転写制御因子や異なる塩基配列を有するDNA断片を見極めることができる。

第二十三の発明は、第二十二の発明において、前記選別工程は、前記選別用物質を、標識化複合体に含有される標識物質とは異なる種類の標識物質に

20 より標識化するとともに、その標識物質に基づいて、その選別用物質と結合した標識化複合体を抽出または分離する工程とを有するものである。本発明によれば、確実かつ容易に目的とする標識化複合体の選別および識別を行うことができる。

第二十四の発明は、第二十の発明または第二十一の発明のいずれかにおいて、前記識別工程は、前記標識物質が発光物質である場合には、その標識化複合体が発する発光波長の各強度の測定結果に基づいて、その種類の量比を

25 割出して、該当する標的を識別するものである。本発明によれば、容易に且つ確実に該当する標的を識別することができる。

第二十五の発明は、第二十の発明または第二十一の発明のいずれかにおい

- て、前記選別工程は、前記標的保有体が二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸であって、前記標識物質および前記担体はその片側の一本鎖にのみ結合している場合には、他方の一本鎖は変性によって除去するとともに、前記選別用物質として、所定塩基配列をもつ核酸を用いたものである。これによって、選
- 5 別用物質の検査用塩基配列と相補性または相同性が高い構造をもつ標的保有体にハイブリダイズする。その標識物質を捕獲した標識化複合体を識別することによって、その標的の構造がわかる。本発明によれば、容易且つ効率的に、特定の塩基配列とハイブリダイズする、相補性または相同性等の関連性の高い塩基配列を見出すことができる。
- 10 第二十六の発明は、第二十の発明または第二十一の発明のいずれかにおいて、前記選別工程は、選別用物質が固定された固定相と前記標識化複合体群が懸濁した液とを接触させる工程と、洗浄して懸濁液を除去することによって、固定相にその選別用物質と結合した標識化複合体を選別する工程とを有するものである。本発明によれば、固定相に捕獲された標識化複合体以外の
- 15 ものを洗浄して除去して標識化複合体を選別するので、選別が容易且つ確実である。

第二十七の発明は、第二十六の発明において、前記選別工程は、前記固定相から物理的または化学的に標識化複合体を溶出して抽出、分離または洗浄等によって選別する工程を有するものである。ここで、「物理的な溶出」に

20 は、振動、衝撃、圧力、熱等を与える場合があり、「化学的な溶出」には、溶液等を加える場合がある。本発明によれば、確実且つ容易に標識化複合体を識別することができる。

第二十八の発明は、第二十六の発明において、前記固定相として磁性体粒子を用い、前記標識化複合体の担体は磁性体粒子または非磁性体粒子で形成

25 されるとともに、その標識化複合体の磁性体粒子は、固定相の磁性体粒子と比較して、同一の外部磁場に対してより小さい磁力を受けるものである。本発明によれば、遠隔操作を利用することができるので、作業や処理を自動化し、迅速且つ容易に処理を行うことができる。

第二十九の発明は、第二十六の発明において、前記選別用物質は、特異的

- な結合をする化合物対の一方を標識物質として標識化されるとともに、前記・別工程において、前記化合物対の他方を固定化した固定相にその選別用物質および標識化複合体の結合体を懸濁した液を接触させて、前記固定相にその結合体を結合させ、その固定相に結合した物以外の物を洗浄して除去し、
- 5 前記標的保有体を変性して一本鎖にして標識化複合体を溶出して抽出または分離によって回収するものである。本発明によれば、先ず、複合体を固定相に捕獲するとともに、捕獲された複合体を抽出して選別するようにしているので、標識化複合体を確実に且つ精度良く識別することができる。

- 第三十の発明は、第二十の発明または第二十一の発明のいずれかにおいて
- 10 、前記選別工程は、前記標識化複合体を発光物質によって標識化し、選別用物質をその標識物質とは異なる種類の発光物質により標識化するとともに、その標識化複合体群が懸濁した液と選別用物質とを混合して接触させる工程と、透光性の細管内に、その選別用物質と結合した標識化複合体を含む標識化複合体群の懸濁液を通過させる工程とを有し、前記識別工程は、前記標識
- 15 化複合体群の懸濁液の前記細管の通過の際に受光する工程と、その選別用物質が発する光の強度の測定により選別された標識化複合体について、その標識化複合体が発する光の強度の測定結果に基づいて、その種類およびその量比を割り出して、該当する標的を識別する工程とを有するものである。

- ここで、懸濁液のその細管内の流速は、例えば、その細管内において標識
- 20 化複合体が1粒子ずつ重ならないように通過するように調節するようにしても良い。その流速は、細管の内径、懸濁液の濃度等によって定まる。本発明によれば、光の強度の測定によって、標識化複合体の選別と標的の識別を同時に行うことができるので、効率良く且つ信頼性良く標的を検出することができる。

- 25 第三十一の発明は、第三十の発明において、前記識別物質または選別用物質が蛍光物質または燐光物質である場合には、前記懸濁液を前記細管内を通過させる工程において、前記細管に向けて、その物質を励起させる励起用光を照射するものである。本発明によれば、確実かつ信頼性高く標的を検出することかできる。

第三十二の発明は、標識化複合体群が懸濁する液を搬送するための搬送用ポンプと、その懸濁液が内部を通過する透光性の細管と、その細管を通過する際に、その標識化複合体の識別物質および選別用物質からの光を受光する受光手段と、前記受光手段が受光した光の強度を解析して、その標識化複合体を選別し、且つ、標的を識別する解析手段と、を有するものである。

前記搬送用ポンプは、例えば、前記細管内で、標識化複合体が重ならないように流れるような流速を与えるように制御する。本発明によれば、光の強度の測定によって、標識化複合体の選別と標的の識別を同時に行うことができるので、効率良く且つ信頼性良く標的を検出ことができる。

10 また、前記細管の径は、使用する標識化複合体の大きさや濃度、流速、液体の量等に応じて定める。

第三十三の発明は、第三十二の発明において、前記識別物質または選別用物質が蛍光物質または燐光物質である場合には、前記細管に向けて、該物質を励起させる励起用光または該物質からの散乱光を得るための散乱用光を外
15 部から照射する照射手段をさらに設けたものである。

第三十四の発明は、第三十二の発明において、前記細管は、閉路の一部を形成するとともに、該閉路によって前記標識化複合体群の懸濁液を循環させるものである。

本発明によれば、懸濁液を循環させて繰り返して測定を行うことができる
20 ので、測定の精度を高めることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の第一の実施の形態に係る標識化複合粒子を示す図である。

25 第2図は、本発明の第一の実施の形態に係る標識化複合粒子の実施例を示す図である。

第3図は、本発明の第二の実施の形態に係る標識化複合粒子の製造方法を示す図である。

第4図は、本発明の第三の実施の形態に係る標識化複合粒子の製造方法を

示す図である。

第5図は、本発明の第四の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図である。

第6図は、本発明の第五の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図である。

第7図は、本発明の第六の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図である。

第8図は、本発明の第七の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図である。

10 第9図は、本発明の第八の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法を示す図である。

第10図は、本発明の第十の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用装置を示す図である。

15 本発明を実施する最良の形態

続いて、本発明の実施の形態に係る標識化複合体並びにその製造方法および使用方法について、第1図～第10図に基づいて説明する。また、この実施例の形態は特に指定のない限り本発明を制限するものではない。

第1図には、第一の実施の形態に係る標識化複合体としての標識化複合粒子10および標識化複合粒子16を示す。該標識化複合粒子10は、第1図(a)に示すように、1個の担体である微小粒子としての磁性体粒子11と、全体として所定の種類(説明の簡単のため2種類としている)が所定の量比で含まれる標識物質としての蛍光物質13(○)、15(△)と、一端14で該微小粒子11にビオチンとアビジンとの特異的結合、吸着または共有結合等の化学的物理的結合を含む結合を利用して前記磁性体粒子11に結合され、他端が蛍光物質13、15に結合し、所定の塩基配列をもつDNA断片(実線)を標的として保有する多数本の標的保有体12とを有する。尚、前記蛍光物質13は、例えば、FITC(緑色)であり、蛍光物質15は、例えば、ローダミン(オレンジ色)またはCy5(サイ・ファイブ、赤色)

20

25

である。該蛍光物質 1 3 と蛍光物質 1 5 は、励起波長、発光波長等で識別されるものである。

第 1 図 (a) では、蛍光物質 1 3 と蛍光物質 1 5 との量比が、全体として例えば 4 対 1 の場合を、説明の簡単のために 5 本の標的保有体 1 2 で図示する。他方、第 1 図 (b) に示す標識化複合粒子 1 6 は、前記標的保有体 1 2 である DNA 断片とは異なる種類の塩基配列をもつ DNA 断片 (点線) をもつ標的保有体 1 7 を示す。尚、第 1 図 (a) と同一の符号は同一の物を示すものである。本実施の形態では、微小粒子に磁性体粒子 1 1 を用いているので、単に標的保有体 1 2 をまとめて担持するだけでなく、磁場によって標識化複合粒子 1 1、1 6 を遠隔操作することができる。特に、磁力手段を設けたピペット手段を用いることによって、種々の操作を自動化することができる。

次に、このような標識化複合粒子が、蛍光を用いた標識物質によって識別可能であることを簡単な実施例で以下に示す。

15 該実施例では、ビーズ (微小粒子) に、前記標的保有体として適当な塩基配列をもつ DNA 断片の一端を固定し、他端に 2 種類の蛍光物質、ここでは、Cy5 (赤色) と FITC (緑色) の量比を変えたものを結合した標識化複合粒子について、個々に蛍光強度を測定して、測定結果について統計処理を行ったものである。

20 本実施例では、2 種類の蛍光物質、Cy5 と FITC の総量を変えず全光量を略一定にし、量比のみを 8 通りに変えて標識化した標識化複合粒子について、識別の程度を測定したものである。やり方は、個々のビーズの Cy5 と FITC との各蛍光強度を測定して数値化し、Cy5 と FITC の蛍光強度の比を計算し、第 2 図に示すビーズの蛍光強度の分布を示す実験結果を得たものである。

第 2 図中「N」、「Min」、「Max」、「Avr.」、「SD」は、それぞれ、測定したビーズの個数、比の最小値、比の最大値、比の平均、比の標準偏差を示すものである。サンプル f01 は、Cy5:FITC=0.1:0.9、サンプル f02 は、Cy5:FITC=0.2:0.8 …のように、総量を一定にし、量比のみを 8 通り変えた

ものを用意している。蛍光強度の分布が正規分布をしていると仮定すると、
Avr. -SD とAvr. +SD の範囲に入る蛍光強度比を有するビーズは約68% であり、
Avr. -2SDからAvr. +2SDの範囲に入るものは約95% となる。第2図のAvr. -2SDとAvr. +2SDの列をみていくと、

- 5 f01 0.14~0.37
 f03 0.46~0.47
 f04 0.49~0.86
 f08 0.89~1.00

となる。このように選択するとどの区分も重なり合わないことから、少なく
10 ともこの4階調は危険率5%以下で分離、識別できることになる。この実験
例では、時間を節約するために、個々の測定したビーズの蛍光の絶対強度が
異常なものや複数のビーズが重なったもの等を完全には除外していないが、
これらを除外することによってさらに階調度の分離精度を上げることができ
る。また、サンプル数を増加させることによって、統計誤差をさらに小さく
15 することができる。

この実施例では、全量がCy5 の場合を含めると、5階調を分離することが
できることになる。同様にして、さらに蛍光物質の種類を増やし、単純にこ
のような組み合わせを、例えば9組用いれは、約200万種類を識別するこ
とができることになる。

20 続いて、第二の実施の形態に係る標識化複合体の製造方法について、第3
図に基づいて説明する。

第3図に示すように、標識化複合体としての標識化複合粒子10を製造す
るには、例えば、二本鎖のDNA20について、DNA領域20aの一本鎖
に対応するDNA断片を第1のプライマ21とし、DNA領域20cの他の
25 一本鎖に対応するDNA断片を第2のプライマ22とする。第1のプライマ
21は、蛍光物質13または蛍光物質15と共有結合等で予め結合させてい
る。また、第2のプライマ22はビオチン18と予め共有結合等で結合して
いる。こうして、PCR法（ポリメラーゼ連鎖反応法）によって、2種類の
前記プライマ21、22とDNA合成酵素（ポリメラーゼ）によってDNA

合成反応を繰り返すことによって、一端に蛍光物質、他端にビオチンを有するDNA断片20全体を、無制限に増幅することができる。この時、蛍光物質13と蛍光物質15が4対1の本数比で結合した第1のプライマを用いることにより、第2図(c)に示すような、二本鎖のDNA断片20の一本鎖23に蛍光13が結合し、他の一本鎖24にビオチン18が結合した標的保有体と、一本鎖23に蛍光15が結合し、他の一本鎖24にビオチン18が結合した標的保有体とか、4対1の本数比で増幅して得られる。

このようにして得られた数万以上というオーダの標的保有体12が懸濁した溶液の中に、磁性体粒子で形成された複数個の微小粒子(ビーズ)11が懸濁した液または微小粒子11のみを、例えば、液通路と、磁力手段をその液通路に近接且つ離間可能に備えたピペット手段を用いて、分注することによって混合、懸濁または攪拌する。

その微小粒子11は、予め、前記ビオチン18と特異的に反応して結合するアビジンを表面にコーティングしておく。すると、その微小粒子11を標的保有体12の懸濁液中に混合、懸濁または攪拌することによって、各微小粒子11の表面にビオチン18が結合している標的保有体12の一端が反応して結合し固定化される。その際、標的保有体12の数が多数であるため、微小粒子11に結合した標的保有体12の他端に結合されている前記蛍光物質13および蛍光物質15の量比は、その懸濁液中の量比をほぼ忠実に反映し、一定の統計誤差内で4対1で結合することになる。この統計誤差は、一様且つ均一に懸濁している前記標的保有体12の量を増加させるに従って、殆ど無視しうる程度にまで収束する。

その微小粒子11に結合する標的保有体12の数は、標的保有体12の数や、反応時間等の条件を変えることによって、コントロールすることができる。その数については、蛍光物質間にエネルギー移動やクエンチングによる大きな影響が生じない範囲で、増加させることにより、発光強度や捕獲能力を高めることができる。

次に、第4図に基づいて、第三の実施の形態に係る該標識化複合体の製造方法について説明する。

第4図(a)に示すように、蛍光物質25と結合したプライマ26、および5'末端に制限酵素の認識配列29を有するプライマ28を用いて、前述したPCRによって、標的保有体27を複製且つ増幅する。二本鎖の前記鋳型DNA断片27とプライマ26および28を用いて、DNA合成酵素によって、DNA断片27を例えば数十万倍以上に増幅する。

第4図(b)に示すように、このようにして得られた二本鎖のDNA断片に対し、制限酵素を加える。制限酵素は、その蛍光物質25が結合していない方に存在する前記切断可能配列29を認識して、そのDNA断片を切断する。

10 第4図(c)で、切断処理された端部と結合可能なDNAリガーゼからなるアダプタ31と結合したビオチン30をそのDNA断片の懸濁液に加える。その際、そのビオチン30は、前記蛍光が結合している方の一本鎖側に結合するようにアダプタ31と結合する。第4図(d)で、そのビオチン30はアダプタ31を介して前記切断処理された標的保有体に結合することになる。
15 このようにして、一本鎖の片側にのみ蛍光物質25と、ビオチン30が結合している標的保有体が得られたことになる。尚、その標的保有体を微小粒子に結合して固定化する工程は、既に説明した工程と同様なので、説明を省略する。

続いて、第四の実施の形態に係る標識化複合体の使用方法について説明する。
20

ここでは、蛋白質32と相互作用を有するDNA断片の塩基配列を見出すために標識化複合粒子を用いるものである。

第5図に示すように、複数種類の標識化複合粒子群、ここでは、説明の簡単のために2種類の標識化複合粒子33、34を用意する。標識化複合粒子
25 33と標識化複合粒子34が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。その標的保有体の一端は両粒子33、34とも各微小粒子に固定されているが、その他端は2種類の蛍光物質13(O)、15(Δ)が、標識化複合粒子33では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子34では1対4の異なる量比で結合している。この量比の差に

よってその標識化複合粒子 3 3、3 4 が有する塩基配列を標識化している。

最初に、その標識化複合粒子 3 3、3 4 を混合した懸濁液を容器に収容しておく。その容器内に、その標識化複合粒子 3 3、3 4 を標識化した標識物質である蛍光物質 1 3 (○)、1 5 (△) と異なる蛍光物質 1 9 (□) で標
5 識化した選別用物質である蛋白質 3 2 を加える。一定時間経過後にその蛍光物質 1 9 を追跡することによって、蛋白質 3 2 がどちらの標識化複合粒子 3 3、3 4 に保持されたか、または保持されなかったかを調べる。蛋白質 3 2 が標識化複合粒子 3 3、3 4 のどちらにも保持されなかった場合には、その蛋白質 3 2 とその DNA 断片の塩基配列との間の関連性がないまたは極めて
10 低いことが見出される。

一方、蛋白質 3 2 が標識化複合粒子 3 3、3 4 のいずれかに保持されたと解析した場合には、その蛋白質 3 2 が結合した標識化複合粒子 (3 3) を選別する。選別された標識化複合粒子 (3 3) の前記蛍光物質 1 3 (○)、1 5 (△) の発光強度を測定することによって、その量比を算定し、蛋白質 3
15 2 を保持した標識化複合粒子 3 3 から、標識化された塩基配列を識別することができる。これによって、蛋白質 3 2 と結合しうる親和性の高い、または関連性の高い塩基配列が特定される。

もし、その標識化複合粒子 3 3、3 4 の双方に蛋白質 3 2 が保持されたことを解析した場合には、蛋白質 3 2 との親和性等の関連性の程度は、各標識
20 化複合粒子 3 3、3 4 が保持した蛋白質 3 2 の量の比較または蛋白質 3 2 を保持した標識化複合粒子 3 3、3 4 の個数比によって親和性の程度等の関連性の高低を判断することもできる。

本実施の形態において、前記標的保有体を複数種類の DNA 断片で形成する代わりに、複数種類の蛋白質等で形成し、その標識化複合粒子を懸濁した
25 液に、選別用物質として、その標識化複合粒子に用いた標識物質と異なる種類の標識物質で標識化した特定の塩基配列をもつ DNA 断片を混合するようにしても良い。この場合には、その塩基配列をもつ DNA 断片と親和性の高い蛋白質が逆に特定されことになる。

本実施の形態は、蛋白質と DNA 断片との間に限られず、DNA 断片同士

間についても適用することができる。これによって、DNA断片の塩基配列間の相補性、相同性の高い構造、相互作用の強さ等の関連性を見出すことができる。また、蛋白質同士間についても適用することができる。これによって、蛋白質間の相互作用を見いだすことができる。尚、本実施形態では、各

5 標識化複合粒子に磁性体粒子を用い、磁力手段を設けたピペット手段またはこれらのピペット手段を複数集積化した装置を用いることによって、その懸濁、攪拌、分離、移送等の作業を自動化することができる。

次に、第五の実施の形態に係る標識化複合体の使用方法について、第6図に基づいて説明する。

- 10 第6図(a)に示すように、複数種類の標識化複合粒子、例えば、2種類の標識化複合粒子35、36を用意する。各標識化複合粒子35と標識化複合粒子36が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。その標的保有体の一端は両粒子35、36とも各微小粒子に固定されているが、その他端は2種類の蛍光物質13(○)、15(
- 15 △)が、標識化複合粒子35では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子36では1対4の量比で結合したものである。その2種類の標識化複合粒子35、36を混合した懸濁液を、選別用物質であるDNA結合蛋白質38が固定化されたマトリクス(固定相)37と接触させるために、そのマトリクス37が設けられている容器に分注する。
- 20 すると、そのDNA蛋白質38と特異的に反応して結合する塩基配列をもつDNA断片の標的保有体をもつ標識化複合粒子35がその蛋白質38と結合してそのマトリクス37に捕獲される。その後、そのマトリクス37に捕獲されていない標識化複合粒子35、36を洗浄した後、捕獲されたその標識化複合粒子35を塩溶液で溶出することによって該当する標識化複合粒子
- 25 35が選別され、蛍光スペクトルを観測して標識化複合粒子35を識別する。

このようにして、その塩基配列との結合に特異性をもつ蛋白質を同定することによって、転写制御因子のような、遺伝子をコントロールすることのできる蛋白質を見出し、生物の発生、ガン等の研究に役立たせることができる。

第五の実施の形態の他の応用例として、第6図(d)に示す例を説明する。第6図(d)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子35a、36aを用意する。標識化複合粒子35aと標識化複合粒子36aが含有する5 標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつDNA断片で形成されている。標的保有体には、2種類の蛍光物質13(○)、15(△)が、その標識化複合粒子35aでは4対1の量比で結合し、標識化複合粒子36aでは1対4の量比で結合している。本実施の形態では、その2種類の標識化複合粒子35a、36aの微小粒子は磁性体粒子で形成され、外部磁場が及ぼされると磁化され外部磁場が除去されると消磁される。その2種類の標識化複合粒子35a、36aを混合した懸濁液を、選別用物質であるDNA結合蛋白質38が固定化された磁性体粒子37aと接触させるために、ピペット手段等によって、その磁性体粒子37aが懸濁する液が収容された容器またはカラム39等に分注する。

15 ここで、前記標識化複合粒子35a、36aが有する磁性体粒子は、DNA結合蛋白質38が固定化された磁性体粒子37aに比べ同一磁場から受ける磁力が小さいものとする。受ける磁力を小さくするには、同一素材で径を小さく形成するかまたは磁化率の小さい素材を用いる。磁力体がピペット手段の液通路の外部に組み込まれて、液通路内へ磁場を及ぼしまたは除去可能なピペット手段を用いることによって、標識化複合粒子35a、36aや磁性体粒子37aの移送や分離等の作業が容易化され且つ自動化される。

また、その磁性体粒子37aは、同一の磁場に対して、その標識化複合粒子35a、36aに含有する磁性体粒子よりも強い磁力を受ける。したがって、その磁性体粒子37aおよび標識化複合粒子35a、36aが懸濁する25 液体が収容された容器、ピペット手段の液通路やカラム39に所定の磁場をかけた状態で、その懸濁液を所定の流速で流すことによって、その磁性体粒子37aのDNA結合蛋白質38に捕獲された標識化複合粒子は、磁性体粒子37aとともに、その容器等の内壁に吸着して分離されるが、その磁性体粒子37aに捕獲されなかった標識化複合粒子は、内壁に吸着する磁力が弱

いため、懸濁液とともに流出することによって選別される。

尚、前記標識化複合粒子の微小粒子として、非磁性体粒子を用いても良い。この場合には、標識化複合粒子に対する磁場の影響は0であるので、捕獲されなかった標識化複合粒子の流出を確実に行うことができる。

- 5 続いて、第六の実施の形態に係る標識化複合粒子の使用方法について、第7図に基づいて説明する。

第7図(a)に示すように、例えば、2種類の標識化複合粒子40、41を用意する。標識化複合粒子40と標識化複合粒子41が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつ二本鎖のDNA断片で形成されている。

- 10 その標識化複合粒子40、41を標識化するために、その標的保有体の他端には、2種類の蛍光物質13(○)、蛍光物質15(△)が標識化複合粒子40では4対1の量比で結合したものであり、標識化複合粒子41では1対4の量比で結合したものである。第7図(b)で、その2種類の標識化複合粒子40、41の標的保有体をアルカリ性溶液等で変性して一本鎖化する。

- 15 第7図(c)で、検査用DIG42で標識化された選別用物質である一本鎖DNA断片43を、前記変性された標識化複合粒子40、41が懸濁している懸濁液中に混合し、第7図(d)で示すように、その一本鎖DNA断片43と、その標識化複合粒子40、41の一方とハイブリダイズするか否かを試みる。ここでは、DIG42は、アンチDIG抗体44と特異的に反応する性質をもつ標識化物質として利用したものである。第7図(e)で、その一本鎖DNA断片43がハイブリダイズした標識化複合粒子40とハイブリダイズしなかった標識化複合粒子41の混合した懸濁液を、アンチDIG抗体44が固定化されたマトリクス45を収容した容器に分注する。第7図(f)で、そのマトリクス45に捕獲されなかった標識化複合粒子40、41を洗浄して選別した後、変性して標識化複合粒子40を溶出し、蛍光スペクトルで識別する。

第六の実施の形態に係る標識化複合体の使用方法の他の応用例として、第7図(g)に基づいて説明する。

第7図(g)に示すように、例えば、標識化複合体として2種類の標識化

複合粒子 40 a, 41 a を用意する。標識化複合粒子 40 a と標識化複合粒子 41 a が含有する各標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつ DNA 断片で形成されている。標的保有体には、2 種類の蛍光物質 13 (○)、15 (△) か、その標識化複合粒子 40 a では 4 対 1 の量比で結合し、標識化複合粒子 41 a では、1 対 4 の量比で結合している。本例では、その 2 種類の標識化複合粒子 40 a, 41 a の微小粒子は磁性体粒子で形成され、外部磁場が及ぼされると磁化され外部磁場が除去されると消磁される。その 2 種類の標識化複合粒子 40 a, 41 a の標的保有体はアルカリ性溶液等で変性して一本鎖化されている。

- 10 検査用の DIG 42 で標識化された一本鎖 DNA 断片 43 を前記変性された標識化複合粒子 40 a, 41 a が懸濁している懸濁液中に混合し、その一本鎖 DNA 断片 43 と、その標識化複合粒子 40 a, 41 a の一方とハイブリタイズするか否かを試みる。第 7 図 (g) に示すように、その一本鎖 DNA 断片 43 がハイブリダイズした標識化複合粒子 40 とハイブリダイズしなかった標識化複合粒子 41 の混合した懸濁液を、アンチ DIG 抗体 44 が固定化された磁性体粒子 45 a の懸濁液を収容した容器、カラム 39 等に分注する。ここで、その標識化複合粒子 40 a, 41 a が有する磁性体粒子は、アンチ DIG 抗体 44 が固定化された磁性体粒子 45 a に比べ同一磁場から受ける磁力が小さいものとする。磁力体がピペット手段の液通路の外部に組み込まれて、液通路内への磁場を及ぼしまたは除去可能なピペット手段を用いることによって、標識化複合粒子 40 a, 41 a や磁性体粒子 45 a の移送や分離等の作業が容易化され且つ自動化される。

- また、その磁性体粒子 45 a は、同一の磁場に対して、その標識化複合粒子 40 a, 41 a に含有する磁性体粒子よりも強い磁力を受ける。したがって、その磁性体粒子 45 a および標識化複合粒子 40 a, 41 a が懸濁する液体が収容された容器、ピペット手段の液通路やカラム 39 に所定の磁場をかけた状態で、その懸濁液を所定の収束で流すことによって、その磁性体粒子 45 a のアンチ DIG 抗体 44 に捕獲された標識化複合粒子は、磁性体粒子 45 a とともに、その容器等の内壁に吸着して分離されるが、その磁性体

粒子 4 5 a に捕獲されなかった標識化複合粒子は、内壁に吸着する磁力が弱い
ため、懸濁液とともに流出して選別することができる。

尚、前記標識化複合粒子の微小粒子として、非磁性体粒子を用いても良い。
この場合には、標識化複合粒子に対する磁場の影響は 0 であるので、捕獲
5 されなかった標識化複合粒子の流出による選別はより確実に行うことができ
る。

第七の実施の形態に係る標識化複合体の使用方法について、第 8 図に基づ
いて説明する。

第 8 図 (a) に示すように、例えば、標識化複合体として 2 種類の標識化
10 複合粒子 4 6、4 7 を用意する。標識化複合粒子 4 6 と標識化複合粒子 4 7
が含有する標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつ DNA 断片で形成さ
れている。標的保有体には、2 種類の蛍光物質 1 3 (○)、蛍光物質 1 5 (△)
かその標識化複合粒子 4 6 では 4 対 1 で結合し、その標識化複合粒子 4
7 では 1 対 4 の量比で結合している。第 8 図 (b) で、その 2 種類の標識化
15 複合粒子 4 6、4 7 を混合した懸濁液中に、蛍光物質 4 8 で標識化された標
的である DNA 結合蛋白質 4 8 が混合される。

第 8 図 (c) で、その標識化複合粒子 4 6 にその DNA 結合蛋白質 4 8 が
結合したとする。第 8 図 (d) で DNA 結合蛋白質 4 8 が標識化する蛍光物
質 4 8 の蛍光スペクトルを測定することによって、その DNA 結合蛋白質 4
20 8 が捕獲された標識化複合粒子 4 6 を選別する。その後、第 8 図 (e) で、
標識化されたその蛋白質 4 8 を除去した後、その標識化複合粒子 4 6 を蛍光
で識別する。

次に、第八の実施の形態に係る標識化複合体の使用方法について、第 9 図
に基づいて説明する。

25 第 9 図 (a) に示すように、例えば、標識化複合体として 2 種類の標識化
複合粒子 5 0、5 1 を用意する。各標識化複合粒子 5 0、5 1 には、各々標
的保有体かその一端で固定されている。標識化複合粒子 5 0 と標識化複合粒
子 5 1 の標的保有体は異なり、別種の塩基配列をもつ DNA 断片で形成され
ている。標的保有体の他端は、2 種類の蛍光物質 1 3 (○)、蛍光物質 1 5

(△)が、標識化複合粒子50では4対1の量比で結合し、標識化複合粒子51では1対4の量比で結合している。第9図(b)で、その2種類の標識化複合粒子50、51を変性して一本鎖化する。第9図(c)で、選別用物質として蛍光52で標識化した一本鎖DNA53を前記懸濁液中に混合させる。

第9図(d)で、例えば、標識化複合粒子50の標的保有体とのハイブリダイズによって捕獲される。第9図(e)で、蛍光スペクトルで各標識化複合粒子50、51で1粒子毎に、前記蛍光52の有無を蛍光スペクトルを測定することによって、標識化されたその一本鎖DNAを捕獲した標識化複合
10 粒子50を選別する。その後、第9図(f)で、標識化されたその一本鎖53を除去した後、その標識化複合粒子50を蛍光で識別する。

第九の実施の形態として、明瞭に外見上個々には現れにくい影響や変化を明瞭且つ効率良く識別観測するために標識化複合体を使用する方法について説明する。

15 温度、放射線量、圧力、重力、磁場、電場、濃度(毒性、試薬等)、電磁波(可視光線、紫外線、X線等)、粒子線、音響等またはこれらを組み合わせたものによる影響が明瞭に外見上の差異が現れにくい程度である場合に、その影響を顕在化または統計的に測定するために標識化複合粒子を使用するものである。本例では、蛋白質やDNA断片等の同一の標的を多数含有した
20 サンプル群を予め用意し、各サンプルに前記影響を及ぼし若しくは段階的に変えたレベル若しくはそれらの組み合わせを及ぼしたものと、及ぼさなかったものを作る。これらの各サンプルを識別するために、そのサンプル数分の種類の標識化複合粒子の懸濁液を用意して、各サンプルと混合させて前記標的を各標的保有体に保持させて標識化する。ここで、各標識化複合粒子
25 の標的保有体は、例えば、特殊なノリ物質が繊維状物質に付着され、種々の標的を保有することができるものである。

その標的を保持した各標識化複合粒子を同一容器に混合して、同一時間、同一濃度等の同一条件で同一処理を一斉に加える。この処理とは、例えば、その蛋白質とDNA断片との親和性への影響を見るため、選別用物質として

、別種の標識物質で標識化されたそのDNA断片を多数混合させる。その標識物質を解析することによって、そのDNA断片が保持された前記標識化複合粒子を選別し、その標識化複合粒子の標識物質を解析することによって、最初に受けた影響を統計的に明瞭に顕在化させて迅速、且つ効率的に測定することかできる。また、本例によれば、木目の細かいレベルによる標識化が可能なので、所定の影響を受ける臨界レベル等を精密に測定または見出すことかできる。

第十の実施の形態に係る標識化複合体の使用装置および使用装置について、第10図に基づいて説明する。

- 10 本実施の形態に係る標識化複合体の使用装置に用いる使用装置である標的解析装置60は標識化複合粒子の選別および標的の識別に使用するものである。ここでは、蛍光物質または燐光物質をその標識化複合粒子および選別用物質の標識物質として用いた例について説明する。その装置60は、液体が内部を通過する管路（または流路）61を有し、その管路61は内部を液体
- 15 が循環可能となるように閉路を形成している。その管路61の一部は、透明ガラス等の透光性の部材で形成された細管62が設けられている。その細管62の外部には、前記蛍光物質または燐光物質を励起するための励起用光を細管62内に照射する照射手段63が設けられている。また、その細管62の外部には、その細管62を挟んで前記照射手段63に向き合うように受光
- 20 手段64が設けられている。照射手段63は、レーザ光源、キセノンランプやキセノン-水銀ランプ等の光源を具備し、前記蛍光物質等に応じて波長幅を選択する。受光手段は光電子増倍管を具備している。また、各手段においてフィルタを用いて必要な波長を選択するようにしても良い。受光手段64には、光の波長とその強度を測定する測定手段を具備している。
- 25 さらに、標的解析装置60は、その受光手段64が受光した光の波長の強度を解析して、選別用物質が結合した標識化複合粒子を選別し、選別された標識化複合粒子の標識物質の種類および量比からその標識化複合粒子の標的を識別する解析手段65を具備している。その解析手段65は、測定された各波長から、蛍光物質等の種類、その相対的な光の強度からその量比を割り

出すための演算を行い、その種類または量比と、対応する標的との関係を示す情報等を格納するためのCPU、メモリ、表示手段等からなる情報処理装置を有している。

その標的解析装置60の前記管路61に沿った適当な位置には、その管路
5 61内に液体を流すための搬送用ポンプ66を設ける。また、その管路61は、前記選別用物質を含む前記標識化複合粒子の懸濁液を収容する容器67、廃棄すべき液を収容する廃棄用タンク68、流路内の液体を収容するタンク69と、前記容器67に収容されている懸濁液を管路61内に吸引するための吸引機構70とが設けられている。これらの要素は、開閉自在に分岐接
10 続する弁71、72、73、74を介して連通する。ここで、前記吸引機構70は、吸引吐出手段を有する前記ピペット手段を用いても良いし、その吸引吐出手段を直接設けたものであっても良い。管路または細管の内径は、使用する標識化複合粒子の径、流速等に応じて定められる。

続いて、本実施の形態に係る標識化複合体使用方法について説明する。

15 蛍光物質または燐光物質を標識物質に用いた前記標識化複合粒子が懸濁した液と、その標識物質とは異なる種類の発光物質により標識化した選別用物質とを混合する。すると、選別されるべき標識化複合粒子にその選別用物質が結合する。選別用物質と結合した標識化複合粒子を含む標識化複合粒子群の懸濁液を前記容器67に収容し、弁71を開いて、吸引機構70によって
20 管路61系内にその懸濁液を吸引する。次に弁71の容器67側を閉じて容器67との間を遮断し、弁73を開いてタンク69から必要量の液体を取り入れた後弁73を閉じて、搬送用ポンプ66を駆動させ懸濁液を管路61系内を循環させる。流速は、前記細管62内において、各標識化複合粒子が測定可能な速度に設定する。このような流速は、管路や細管の内径、その標識
25 化複合粒子の径、濃度等によって定められる。

その懸濁液が細管62を通過する際に、細管62の外部からその細管62に照射手段63から励起用光を照射し、識別化複合粒子が発するその細管62からの光を受光手段64によって受光する。受光手段64は各粒子毎に光を受光することが可能なので、受光手段64が得た各波長の光の強度の測定

から、前記解析手段 6 5 は選別用物質が結合している標識化複合粒子を割り出し、割り出された標識化複合粒子の標識物質の種類およびその量比から、標的を識別する。尚、受光手段 6 4 が複数の標識化複合粒子が重なった光を受光したとしても、本実施の形態では、その管路 6 1 系は閉じているので、

5 十分な測定精度を得るために、必要な回数繰り返して懸濁液を循環させることによって、このような誤検出を排除することできる。処理が終了した後は、弁 7 2 を開いて廃棄用タンク 6 8 に収容する。

本実施の形態によれば、標識化複合粒子の選別と識別とを同時に行うことができるので処理の効率が良く、信頼性が高い。また、本実施の形態によれば、懸濁液を循環させることができるので、精度の高い測定を行うことができるのでやはり信頼性が高い。

10

以上説明した各実施の形態は、本発明をより良く理解させるために具体的に説明したものであって、別形態を制限するものではない。したがって、発明の主旨を変更しない範囲で変更可能である。例えば、以上の説明では、担

15 体として微小粒子を用いた標識化複合粒子の場合についてのみ説明したが、その場合に限られることなく、例えば、繊維状物質やゲル状物質等の物質や、不定形の物質等を用いたものであっても良い。また標識物質として 2 種類の蛍光物質を用いたか、その場合に限られることなく多種類または燐光物質であってても良い。また、あたかも 5 個の標的保有体が微小粒子に固定されて

20 いる場合のみについて説明したが、これは説明の簡単のために、量比を説明しやすくするために用いたものであって、実際には多数の標識物質を用いるものである。さらに、以上の説明は、標的保有体として、DNA断片を用いた場合のみを説明したかこの場合に限定されるものではない。また、以上の実施の形態では、標識化複合粒子を製造する際に、核酸をPCR法を用いて

25 合成および増幅する場合について説明したが、その場合に限られることなく、例えば、互いに相補的な一本鎖を合成してアニーリングによって二本鎖を形成することによって製造するものであっても良い。

請 求 の 範 囲

1. 1個の担体と、その担体に結合した多数の標的保有体と、その担体が結合した部位と異なる部位で各標的保有体に結合した標識物質とからなり、
- 5 その標的保有体は、1または2以上の種類の標的を保有しまたは保有可能であり、その標識物質の全体は、所定の種類が所定の量比含まれたものであることを特徴とする標識化複合体。
2. 前記標識物質の全体は、1個の担体と結合する標的保有体の略全てに分配され、1個の前記標的保有体は1種類の標識物質と結合したものである
- 10 ことを特徴とする請求項1に記載の標識化複合体。
3. 前記標的保有体は、ある部位で前記担体と結合し、他の部位で前記標識物質と結合した線状、糸状、毛状、または棒状等の長細形状に形成されたものであることを特徴とする請求項1または請求項2のいずれかに記載の標識化複合体。
- 15 4. 前記標的保有体は、核酸、ペプチド、蛋白質、多糖体若しくは脂質等の生体高分子を含む化合物、ウィルス若しくは細菌等の生物体若しくはその一部、または、これらを保持し、若しくは保持可能な物質からなることを特徴とする請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の標識化複合体。
5. 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記
- 20 標識物質は、ある部位における一本鎖とのみ結合し、他の部位における他の一本鎖が前記担体と結合したものであることを特徴とする請求項1ないし請求項4のいずれかに記載の標識化複合体。
6. 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記標識物質は、一本鎖のある部位にのみ結合し、その一本鎖の他の部位に前記
- 25 担体が固定したものであることを特徴とする請求項1ないし請求項4のいずれかに記載の標識化複合体。
7. 前記標的保有体は、一本鎖の核酸であることを特徴とする請求項1ないし請求項4のいずれかに記載の標識化複合体。
8. 前記標識物質は、蛍光物質、燐光物質、または化学発光等による発光

物質であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれかに記載の標識化複合体。

9. 前記発光物質は、励起波長、発光波長、発光強度、発光偏光度、発光位相または発光寿命のいずれかによって、その種類が識別可能であることを

5 特徴とする請求項 8 に記載の標識化複合体。

10. 前記担体には、アビジンおよびビオチン等の特異的に結合する化合物対の一方の化合物がコーティングされ、前記標的保有体は所定塩基配列をもつ DNA 断片であり、ある部位には前記化合物対の他方の化合物が結合し、他の部位には前記発光物質が結合したものであることを特徴とする請求項

10 1 ないし請求項 4 のいずれかに記載の標識化複合体。

11. 前記担体は、遠隔操作可能な磁性体粒子等の遠隔作用体を有することを特徴とする請求項 1 ないし請求項 10 のいずれかに記載の標識化複合体。

12. 請求項 1 ないし請求項 11 のいずれかに係る標識化複合体を製造する方法において、ある部位で標識物質と結合し、且つ特定の標的を保有しまたは保有可能な標的保有体を生成する工程と、その標的保有体を担体に結合する工程とを有することを特徴とする標識化複合体製造方法。

13. 前記担体に標的保有体を結合する工程は、標識物質の全体が、その標的保有体の種類またはその種類および個数比に応じて定められた種類およびその量比となるように、その標識物質と結合した標的保有体を多数懸濁させた液体中に、その標的保有体が結合されるべき担体を混合することによって行うことを特徴とする請求項 12 に記載の標識化複合体製造方法。

14. 前記標的保有体を生成する工程は、標識物質と結合し且つ所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸を合成し、その塩基配列と関連性の高い、前記担体と結合可能に加工された他の一本鎖の核酸を合成し、これらをアニーリングによって二本鎖の核酸を生成する工程を有することを特徴とする請求項 12 に記載の標識化複合体製造方法。

15. 前記標的保有体を生成する工程は、前記標識物質と結合し且つ所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第 1 のプライマと、前記担体と結合

すべき他の一本鎖の核酸の複製用の第2のプライムとを用いて、二本鎖のその核酸を合成しかつ増幅する工程を有することを特徴とする請求項12に記載の標識化複合体製造方法。

- 5 16. 前記標的保有体を担体に結合する工程または前記標的保有体を生合成する工程は、前記標識物質または前記担体のどちらか一方と結合し且つ所定塩基配列をもつ一本鎖の核酸の複製用の第1のプライムを用いて、二本鎖のその核酸を合成および増幅するとともに、前記標識物質または担体が結合している端部と反対側の端部に制限酵素処理を施し、制限酵素処理が施された端部にDNAリガーゼ等からなるアダプタを介して担体または標識物質を、
- 10 前記標識物質または担体が結合している一本鎖側に結合して、標的保有体を担体に結合し、または標的保有体を生合成することを特徴とする請求項12に記載の標識化複合体製造方法。
17. 前記標的保有体を生合成する工程は、前記標識物質および前記担体と結合していない方の一本鎖を変性によって除去する工程を含むことを特徴とする請求項16に記載の標識化複合体製造方法。

18. 前記担体に標的保有体を結合する工程は、担体が有する多数の穴、間隙若しくは凹凸による付着、吸着、接着、ヒスチンとアビジン等の特異的相互作用等の物理的若しくは化学的結合を含む結合を利用して、前記標的保有体と担体とを懸濁することによって、前記標的保有体と担体とを結合することを特徴とする請求項12に記載の標識化複合体製造方法。
- 20 19. 前記標的保有体を生合成する工程は、ある部位でその標識物質と結合し且つ他の部位で特異的に結合する化合物対の一方と結合した多数の標的保有体を生合成する工程であり、前記標的保有体を担体に結合する工程は、前記化合物対の他方がコーティングされた担体と、その標識物質が結合した前記標的保有体とを液体中で懸濁することによって、その標的保有体を担体に結合すること

20. 請求項1ないし請求項11のいずれかに係る標識化複合体の標的およびその標的に対応付けられた標識物質の種類若しくは量比が相互に異なる複数種類の標識化複合体を多数有する標識化複合体群の中から、目的とする

種類の標識化複合体を選別する工程と、選別されたその標識化複合体が標識化した標的を識別する工程とを有することを特徴とする標識化複合体使用方法。

21. 前記選別工程は、液通路と、その液通路内に磁場作用を及ぼすこと

5 可能な磁力手段とを有し、液体の吸引または吐出を行うピペット手段を用いて、前記標識化複合体に対して、またはその標識化複合体および選別用物質に対して、定量、分離、分取、分注、清澄、懸濁、攪拌、濃縮、希釈、混合、接触、捕獲、保持、洗浄、変性、イソキユベーション、温度制御、抽出、回収または移送等の作業によりまたはこれらの作業の組み合わせによって10、行われることを特徴とする請求項20に記載の標識化複合体使用方法。

22. 前記選別工程は、前記標識化複合体群を懸濁する工程と、その標識化複合体群が懸濁した懸濁液と、目的とする標識化複合体を選別するための選別用物質とを接触させる工程と、その選別用物質と結合した標識化複合体を抽出または分離する工程とを有することを特徴とする請求項20または請求項21のいずれかに記載の標識化複合体使用方法。

23. 前記選別工程は、前記選別用物質を、標識化複合体に含有される標識物質とは異なる種類の標識物質により標識化するとともに、その標識物質に基づいて、その選別用物質と結合した標識化複合体を抽出または分離する工程を有することを特徴とする請求項22に記載の標識化複合体使用方法。

24. 前記識別工程は、前記標識物質が発光物質である場合には、その標識化複合体が発する発光波長の各強度の測定結果に基づいて、その種類の量を割出して、該当する標的を識別することを特徴とする請求項20または請求項21のいずれかに記載の標識化複合体使用方法。

25. 酸であって、前記標識物質および前記担体はその片側の一本鎖にのみ結合している場合には、他方の一本鎖は変性によって除去するとともに、前記選別用物質として、所定塩基配列をもつ核酸を用いたことを特徴とする請求項20または請求項21のいずれかに記載の標識化複合体使用方法。

26. 前記選別工程は、選別用物質が固定された固定相と前記標識化複合

体群が懸濁した液とを接触させる工程と、洗浄して懸濁液を除去することによって、固定相にその選別用物質と結合した標識化複合体を選別する工程とを有することを特徴とする請求項 20 または請求項 21 のいずれかに記載の標識化複合体使用方法。

5 27. 前記選別工程は、前記固定相から物理的または化学的に標識化複合体を溶出して抽出、分離、または洗浄等によって選別する工程を有すること
を特徴とする請求項 26 に記載の標識化複合体使用方法。

28. 前記固定相として磁性体粒子を用い、前記標識化複合体の担体は磁性体粒子または非磁性体粒子で形成されるときに、その標識化複合体の磁性体粒子は、固定相の磁性体粒子と比較して、同一の外部磁場に対してより小さい磁力を受けることを特徴とする請求項 26 に記載の標識化複合体使用方法。

29. 前記選別用物質は、特異的な結合をする化合物対の一方の標識物質で標識化されるときに、前記選別工程において、前記化合物対の他方を固定化した固定相にその選別用物質および標識化複合体の結合体を懸濁した液を接触させて、前記固定相にその結合体を結合させ、その固定相に結合した物以外の物を洗浄して除去し、前記標的保有体を変性して一本鎖にして標識化複合体を溶出して抽出または分離によって選別する工程を有することを特徴とする請求項 26 に記載の標識化複合体使用方法。

20 30. 前記選別工程は、前記標識化複合体を発光物質によって標識化し、選別用物質をその標識物質とは異なる種類の発光物質により標識化するとともに、その標識化複合体群が懸濁した液と選別用物質とを混合して接触させる工程と、透光性の細管内に、その選別用物質と結合した標識化複合体を含む標識化複合体群の懸濁液を通して工程とを有し、前記選別工程は、前記選別用物質が発する光の強度の測定により選別された標識化複合体について、その標識化複合体が発する光の強度の測定結果に基づいて、その種類およびその量比を割り出して、該当する標的を識別する工程とを有することを特徴とする請求項 20 または請求項 21 のいずれかに記載の標識化複合体使用方法

25 記標識化複合体群の懸濁液の前記細管の通過の際に受光する工程と、その選別用物質が発する光の強度の測定により選別された標識化複合体について、その標識化複合体が発する光の強度の測定結果に基づいて、その種類およびその量比を割り出して、該当する標的を識別する工程とを有することを特徴とする請求項 20 または請求項 21 のいずれかに記載の標識化複合体使用方法

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 27 OCT 2000

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PS-99002	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03824	国際出願日 (日.月.年) 15.07.99	優先日 (日.月.年) 22.07.98
国際特許分類 (IPC) Int. C1 ⁷ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22		
出願人 (氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。 <input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で 2 ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 21.02.00	国際予備審査報告を作成した日 17.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9549

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-31 ページ、 出願時に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-31, 33, 34 項、 出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 1, 32, 35 項、 13.07.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-10 ページ/図、 出願時に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-35 有
 請求の範囲 無

進歩性(1S)

請求の範囲 1-35 有
 請求の範囲 無

産業上の利用可能性(1A)

請求の範囲 1-35 有
 請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: 田島秀二「磁性体微粒子による核酸分離・抽出の自動化」日本応用磁気学会誌(1998, May) 第22巻 第5号 p. 1010-1015

文献2: JP, 9-28397, A (タイト、インターナショナル、インコーポレイテッド) 4.2月. 1997 (04.02.97)

文献3: JP, 6-343496, A (株式会社日立製作所) 4.2月. 1997 (04.02.97)

請求の範囲 1-35

請求の範囲 1-35 に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~3に対して進歩性を有する。

文献1~3には、標識物質を結合してなる標的保有体を担体に結合して得られる標識化複合体において、各種標識物質の量比を変更することによって、他種類の標的を識別することは記載されておらず、一方、本願発明はそれによって、標識物質の種類数やその単なる混合を使用しても識別できない程度の多数種類の標的を明瞭に識別することができるという効果を発揮する。

請 求 の 範 囲

1. (補正後) 1個の担体と、その担体に結合した多数の標的保有体と、その担体が結合した部位と異なる部位で各標的保有体に結合した標識物質と
5 からなり、その標的保有体は、前記2つの部位間で1または2以上の種類の
標的を保有しまたは保有可能であり、その標識物質の全体は、2以上の所定
の種類が所定の量比含まれたものであることを特徴とする標識化複合体。
2. 前記標識物質の全体は、1個の担体と結合する標的保有体の略全てに
分配され、1個の前記標的保有体は1種類の標識物質と結合したものである
10 ことを特徴とする請求項1に記載の標識化複合体。
3. 前記標的保有体は、ある部位で前記担体と結合し、他の部位で前記標
識物質と結合した線状、糸状、毛状、または棒状等の長細形状に形成された
ものであることを特徴とする請求項1または請求項2のいずれかに記載の標
識化複合体。
- 15 4. 前記標的保有体は、核酸、ペプチド、蛋白質、多糖体若しくは脂質等
の生体高分子を含む化合物、ウィルス若しくは細菌等の生物体若しくはその
一部、または、これらを保持し、若しくは保持可能な物質からなることを特
徴とする請求項1ないし請求項3のいずれかに記載の標識化複合体。
5. 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記
20 標識物質は、ある部位における一本鎖とのみ結合し、他の部位における他の
一本鎖が前記担体と結合したものであることを特徴とする請求項1ないし請
求項4のいずれかに記載の標識化複合体。
6. 前記標的保有体は、二本鎖の所定塩基配列をもつ核酸からなり、前記
標識物質は、一本鎖のある部位にのみ結合し、その一本鎖の他の部位に前記
25 担体が固定したものであることを特徴とする請求項1ないし請求項4のいず
れかに記載の標識化複合体。
7. 前記標的保有体は、一本鎖の核酸であることを特徴とする請求項1な
いし請求項4のいずれかに記載の標識化複合体。
8. 前記標識物質は、蛍光物質、燐光物質、または化学発光等による発光

法。

3 1. 前記識別物質または選別用物質が蛍光物質または燐光物質である場合には、前記懸濁液を前記細管内を通過させる工程において、前記細管に向けて、その物質を励起させる励起用光を照射することを特徴とする請求項 3 5 0 に記載の標識化複合体使用方法。

3 2. (補正後) 標識化複合体群が懸濁する液を搬送する搬送用ポンプと、その懸濁液が内部を通過する透光性のある細管と、その細管を通過する際に、その標識化複合体の識別物質および選別用物質からの光を受光する受光手段と、前記受光手段が受光した光の強度を解析して、その請求項 1 ないし 10 請求項 1 1 に係る標識化複合体を選別し、且つ、標的を識別する解析手段と、を有することを特徴とする標識化複合体を使用した標的解析装置。

3 3. 前記識別物質または選別用物質が蛍光物質または燐光物質である場合には、前記細管に向けて、その物質を励起させる励起用光またはその物質からの散乱光を得るための散乱用光を外部から照射する照射手段をさらに設けたことを特徴とする請求項 3 2 に記載の標識化複合体を使用した標的解析装置。

3 4. 前記細管は、閉路の一部を形成するとともに、その閉路によって前記標識化複合体群の懸濁液を循環させるものであることを特徴とする請求項 3 2 に記載の標識化複合体を使用した標的解析装置。

20 3 5. (追加) 1 個の担体と、その担体に結合した多数の標的保有体と、その担体が結合した部位と異なる部位で各標的保有体に結合した標識物質とからなり、その標的保有体は、1 または 2 以上の種類の標的を保有しまたは保有可能であり、その標識物質の全体は、所定の種類が所定の量比含まれた標識化複合体について、その標的およびその標的に対応付けられた標識物質
 25 の種類若しくは量比が相互に異なる複数種類の標識化複合体を多数有する標識化複合体群を液体中に懸濁した標識化複合体懸濁液。

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PS-99002	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03824	国際出願日 (日.月.年) 15.07.99	優先日 (日.月.年) 22.07.98
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	田島秀二「磁性体微粒子による核酸分離・抽出の自動化」日本応用 磁気学会誌 (1998, May) 第22巻 第5号 p. 1010-1015	1-34
Y	JP, 9-28397, A (デイト、インターナショナル、インコーポレーテッド) 4. 2月. 1997 (04. 0 2. 97) & WO, 91/09141, A & AU, 9171746, A & EP, 463144, A & JP, 4-50 3968, A & AU, 634631, B & US, 5283079, A & US, 5395688, A & EP, 4631 44, A4 & EP, 463144, B & JP, 2589618, B2 & DE, 69029908, E & ES, 209 9156, T3 & JP, 2762259, B2	1-34
Y	JP, 6-343496, A (株式会社日立製作所) 20. 12月. 1994 (20. 12. 94) ファミリーなし	1-34

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 10. 99

国際調査報告の発送日 26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C.20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 29 March 2000 (29.03.00)	Applicant's or agent's file reference PS-99002
International application No. PCT/JP99/03824	
International filing date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)	Priority date (day/month/year) 22 July 1998 (22.07.98)
Applicant MACHIDA, Masayuki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 February 2000 (21.02.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Christelle Croci

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/03824

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Shuuji Tajima, "Jiseitai biryuushi ni yoru kakusan bunri chuushutsu no jidouka", Journal of the Applied Magnetics Assoc. of Japan (1998, May) Vol. 22, No. 5, p.1010-1015	1-34
Y	JP, 9-28397, A (Dade International Inc.), 4 February, 1997 (04. 02. 97) & WO, 91/09141, A & AU, 9171746, A & EP, 463144, A & JP, 4-503968, A & AU, 634631, B & US, 5283079, A & US, 5395688, A & EP, 463144, A4 & EP, 463144, B & JP, 2589618, B2 & DE, 69029908, E & ES, 2099156, T3 & JP, 2762259, B2	1-34
Y	JP, 6-343496, A (Hitachi, Ltd.), 20 December, 1994 (20. 12. 94) (Family: none)	1-34

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 October, 1999 (13. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
26 October, 1999 (26. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

発信人 日本国特許庁 (国際調査機関)

出願人代理人
土橋 皓

あて名

殿

〒 105-0001
東京都港区虎ノ門1の17の3
第12森ビル 6階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書(法施行規則第41条)
(PCT規則44.1)

発送日

(日.月.年)

26.10.99

出願人又は代理人
の書類記号

PS-99002

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/J P 99/03824

国際出願日

(日.月.年)

15.07.99

出願人 (氏名又は名称)

工業技術院長が代表する日本国

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる (PCT規則46参照)。
いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。
どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項 (PCT17条(2)(a)) の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
3. ☐ 法施行規則第44条 (PCT規則40.2) に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。
- ☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。
- ☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで (官庁によってはもっと遅く) 国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 N

9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。

3. 文献の写しの請求について

国際調査報告に記載した文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

- (1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)

○必要部数

- (2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT 19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT 19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT 19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。

国際段階においてPCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続きにおいて請求の範囲を（更に）補正することができる。

明細書及び図面は、PCT 34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。

国内段階に移行する際、PCT 28条（又はPCT 41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した／する場合については、以下を参照すること。

どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。

差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。

差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直すなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。

補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。

書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT 19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT 19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。

書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。

書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。

- (i) この請求の範囲は変更しない。
- (ii) この請求の範囲は削除する。
- (iii) この請求の範囲は追加である。
- (iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
- (v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。

次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PS-99002	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03824	国際出願日 (日.月.年) 15.07.99	優先日 (日.月.年) 22.07.98
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	田島秀二「磁性体微粒子による核酸分離・抽出の自動化」日本応用磁気学会誌 (1998, May) 第22巻 第5号 p. 1010-1015	1-34
Y	JP, 9-28397, A (デイト、インターナショナル、インコーポレイテッド) 4.2月.1997 (04.02.97) & WO, 91/09141, A & AU, 9171746, A & EP, 463144, A & JP, 4-503968, A & AU, 634631, B & US, 5283079, A & US, 5395688, A & EP, 463144, A4 & EP, 463144, B & JP, 2589618, B2 & DE, 69029908, E & ES, 2099156, T3 & JP, 2762259, B2	1-34
Y	JP, 6-343496, A (株式会社日立製作所) 20.12月.1994 (20.12.94) ファミリーなし	1-34

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.10.99

国際調査報告の発送日

26.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

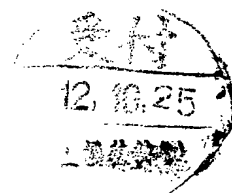
4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人
土橋 皓

殿

PCT

あて名

〒 105-0001
東京都港区虎ノ門1丁目17番3号
第12森ビル 6階

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）
〔PCT規則71.1〕

発送日
（日.月.年） 24.10.00

出願人又は代理人
の書類記号

PS-99002

重要な通知

国際出願番号

PCT/J P 99/03824

国際出願日

（日.月.年） 15.07.99

優先日

（日.月.年） 22.07.98

出願人（氏名又は名称）

工業技術院長が代表する日本国

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4 N 9 5 4 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。
- その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）

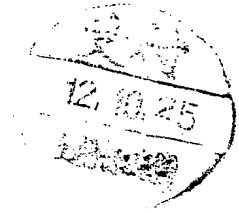
P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 PS-99002	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/03824	国際出願日 (日.月.年) 15.07.99	優先日 (日.月.年) 22.07.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/10, C12N11/00, C12Q1/68, C07K1/22		
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。	
<input checked="" type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で <u>2</u> ページである。	
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。	
I	<input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎
II	<input type="checkbox"/> 優先権
III	<input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
IV	<input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如
V	<input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
VI	<input type="checkbox"/> ある種の引用文献
VII	<input type="checkbox"/> 国際出願の不備
VIII	<input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見



国際予備審査の請求書を受理した日 21.02.00	国際予備審査報告を作成した日 17.10.00	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 引地 進 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 9 5 4 9

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☐ 出願時の国際出願書類

☒ 明細書 第 1-31 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 請求の範囲 第 2-31, 33, 34 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 1, 32, 35 項、 13.07.00 付の書簡と共に提出されたもの

☒ 図面 第 1-10 ~~ページ~~図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 ページ/図、 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分 第 ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 ページ、 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲	1-35	有
請求の範囲		無

進歩性(IS)

請求の範囲	1-35	有
請求の範囲		無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲	1-35	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: 田島秀二「磁性体微粒子による核酸分離・抽出の自動化」日本応用磁気学会誌(1998, May)第22巻 第5号 p.1010-1015

文献2: JP, 9-28397, A (デイト、インターナショナル、インコーポレイテッド) 4.2月.1997 (04.02.97)

文献3: JP, 6-343496, A (株式会社日立製作所) 4.2月.1997 (04.02.97)

請求の範囲1-35

請求の範囲1-35に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1~3に対して進歩性を有する。

文献1~3には、標識物質を結合してなる標的保有体を担体に結合して得られる標識化複合体において、各種標識物質の量比を変更することによって、他種類の標的を識別することは記載されておらず、一方、本願発明はそれによって、標識物質の種類数やその単なる混合を使用しても識別できない程度の多数種類の標的を明瞭に識別することができるという効果を発揮する。

3-T
07/2000/46
Translation
2744

PATENT COOPERATION TREATY

1744

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PS-99002	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/03824	International filing date (day/month/year) 15 July 1999 (15.07.99)	Priority date (day/month/year) 22 July 1998 (22.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/10, 11/00, C12Q 1/68, C07K 1/22		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR-GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).	
These annexes consist of a total of <u>2</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

RECEIVED
FEB 27 2000
TECHNOLOGY CENTER
1700

Date of submission of the demand 21 February 2000 (21.02.00)	Date of completion of this report 17 October 2000 (17.10.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03824

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
 pages 1-31, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
 pages 2-31,33,34, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages 1,32,35, filed with the letter of 13 July 2000 (13.07.2000)
- ☒ the drawings:
 pages 1-10, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:
- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP 99/03824

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-35	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: Shuuji Tajima, "Automation of nucleic acid separation and extraction by means of fine magnetic particles", Journal of the Applied Magnetism Association of Japan (1996, May), Vol. 22, No. 5, pp. 1010-1015

Document 2: JP, 9-28397, A (Dade International Inc.), 4 February 1997 (04.02.97)

Document 3: JP, 6-343496, A (Hitachi, Ltd.), 4 February 1997 (04.02.97)

Claims 1-35

The invention described in Claims 1-35 involves an inventive step relative to Documents 1-3 cited in the international search report.

Documents 1-3 do not disclose labelled complexes formed by binding label-bound target-carrying substances to a support, wherein many different targets are identified by varying the weight ratios of the different labelling substances, and due to this feature the invention of the present application offers the advantageous effect of enabling clear identification of many different targets which cannot be identified by simply mixing a number of labelling substances.